

Aus dem Physiologischen Institut,
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

NEGATIV CHRONOTROPE WIRKUNGEN DER
VERAPAMIL - ENANTIOMERE
AN ISOLIERTEN KULTIVIERTEN HERZZELLEN
UND ISOLIERTEN VORHÜFEN
NEUGEBORENER RATTEN

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Volker Schwamborn
1980

1980

Aus dem Physiologischen Institut,
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

NEGATIV CHRONOTROPE WIRKUNGEN DER
VERAPAMIL - ENANTIOMERE
AN ISOLIERTEN KULTIVIERTEN HERZZELLEN
UND ISOLIERTEN VORHÜFEN
NEUGEBORENER RATTEN

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Volker Schwamborn

1980



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
Zusammenfassung	1
Einleitung	3
Material und Methode	6
Material	6
Methode	8
Zellkultivation	8
Registrierung der Zellkontraktionen	9
Versuchsablauf	11
Isolierte Vorhöfe	11
Ergebnisse	13
Experimente an isolierten kultivierten	
Herzmuskel-Einzelzellen	13
Spontanfrequenzen der Herzmuskelzellen	13
Positiv chronotroper Effekt von Ca^{++}	15
Reversible negativ chronotrope Effekte	
der Verapamil-Enantiomere	16
Zeitliche Unterschiede der Gleichgewichts-	
einstellung für die negativ chronotropen	
und die negativ inotropen Effekte beider	
Verapamil-Enantiomere an Einzelzellen	18
Dosis-Wirkungskurven für die Verapamil-	
Enantiomere an Rattenherz-Einzelzellen	21
Prozentuale Normierung der Frequenzeffekte	
für spontan schlagende Einzelzellen	21
Definition der Vergleichsparameter:	
Inhibitory concentration (IC)	
Isomerischer Quotient (IQ)	24
Dosis-Wirkungskurven des negativ chronotropen	
Effekts der Verapamil-Enantiomere an	
Rattenherz-Einzelzellen	26



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548220_0024

Effekte der Verapamil-Enantiomere in Gegenwart von Tetrodotoxin (TTX)	26
Experimente an isolierten rechten Vorhöfen neugeborener Ratten	29
Spontanfrequenz der Vorhöfe	29
Negativ chronotroper Effekt der Verapamil- Enantiomere an isolierten Vorhöfen	30
Diskussion	31
Literaturverzeichnis	38

Zusammenfassung

Die Effekte der Enantiomere (+)- und (-)-Verapamil wurden an isolierten kultivierten Herzmuskelzellen und an isolierten rechten Vorhöfen neugeborener Ratten vergleichend untersucht.

Beide Substanzen wirken reversibel negativ chronotrop und negativ inotrop an beiden Versuchsobjekten, auch in Gegenwart von Tetrodotoxin. (-)-Verapamil wirkt immer 3-4mal stärker als (+)-Verapamil. Die Effekte sind unabhängig von der Ca^{++} -Konzentration des Mediums. Die Gleichgewichtseinstellung für den negativ chronotropen Effekt verläuft 2-5mal schneller als die für den negativ inotropen Effekt. Rattenherz-Einzelsellen sind etwa 25mal empfindlicher gegenüber Verapamil als der rechte Vorhof.

Diskutiert wird, daß die Verapamil-Enantiomere an Schrittmacherzellen offenbar weder über den schnellen Na^+ -Kanal noch über den langsamen Ca^{++} -Einstrom wirken, sondern möglicherweise über einen langsamen Na^+ -Einwärtskanal oder über eine Hemmung des langsamen K^+ -Auswärtsstromes. Jedenfalls ist der Wirkungsmechanismus hier nicht stereospezifisch, sondern stereoselektiv.

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf der
17. Frühjahrstagung der Deutschen Pharmakologischen
Gesellschaft, 1976, vorgetragen:

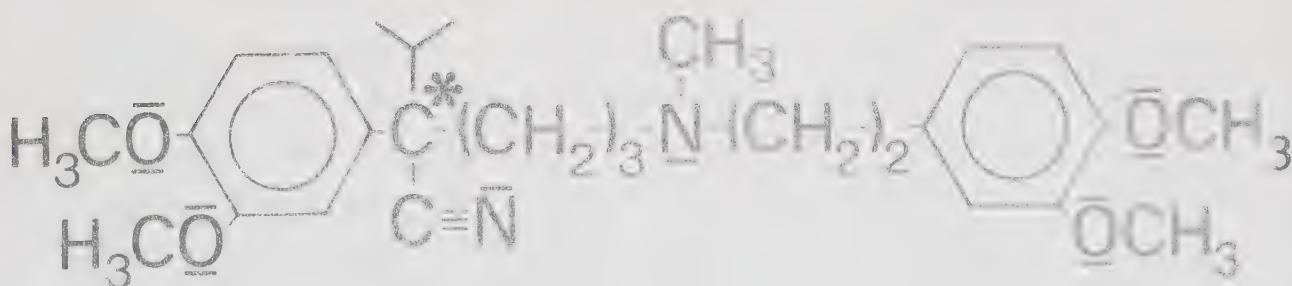
Schwamborn, V., Wittmann R., Kaumann A.J.:

Negative chronotropic and inotropic effects of
enantiomers of Verapamil on spontaneously beating
cells and atria of new-born rats.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharm. 293 R 85 (1976)

Einleitung

Verapamil fand zunächst klinische Anwendung in der Behandlung der Angina pectoris, nachdem Haas u. Härtfelder (1962) und Melville et al. (1964) die coronar-dilatatorische Wirkung dieser Substanz nachgewiesen hatten. Melville et al. (1964) verhinderten mit Verapamil experimentell erzeugte ventrikuläre Fibrillationen. Daß dieser antiarrhythmische Effekt nicht - wie ursprünglich angenommen - auf einer Blockade der adrenergen β -Rezeptoren des Herzmuskels beruht, zeigten Kaumann u. Aramandia (1968). Fleckenstein et al. (1968, 1969) ordneten die Substanz in die Gruppe der sog. "Calcium-Antagonisten" ein. Die negativ inotrope Wirkung des Verapamils wurde bald auch am Uterus (Fleckenstein et al. 1971), an der glatten Gefäßmuskulatur (Haeusler 1972) und am Skelettmuskel (Chiarandini et al. 1973, Kaumann et al. 1976) festgestellt.



Struktur des Verapamil



assymmetrisches C-Atom

Die negativ chronotrope "calcium-antagonistische" Wirkung des Verapamil-Racemats zeigten Kaufmann et al. (1970) an isolierten kultivierten Hühner-Herzmuskel-Zellen, deren adrenerge β -Rezeptoren keine funktionelle Verbindung zu den chronotropen Ionenkanälen der Zellmembran besitzen (Wittmann 1978). Dies sprach bereits für eine direkte Wirkung der Substanz auf die Permeabilität der Ionenkanäle erregbarer Zellmembranen, die sich inzwischen vielfältig bestätigt hat.

Ein wesentlicher Wirkungsmechanismus ist die Blockade des langsamen Ca^{++} - oder $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^{+}$ -Einwärtskanals (Kohlhardt et al. 1972, Shinegobu et al. 1974, Bassingthwaighe et al. 1976). Weiter fanden Baker et al. (1973) am Tintenfisch-Riesenaxon neben der Hemmwirkung am langsamen Ca^{++} -Kanal auch eine Hemmung des schnellen Na^{+} -Einwärtsstromes durch das Verapamil-Derivat D 600. Weiterhin wird eine verminderte Aktivierung des langsamen K^{+} -Auswärtsstromes durch Verapamil und D 600 beschrieben (Kass u. Tsien 1975, Kostyuk et al. 1975).

Die negativ chronotrope Wirkung des racemischen Verapamils (Kaumann u. Aramendia 1968, Singh u. Vaughan Williams 1972, Zipes u. Mendez 1974) wird auch von den Enantiomeren hervorgerufen. Jedoch wirkt (-)-Verapamil etwa 3 mal (Kaumann u. Serur 1975) bis 8 mal (Raschack 1976, Kaumann u. Uchitel 1976) so stark wie (+)-Verapamil. Bayer et al. (1975) schlossen anhand der beobachteten Veränderungen des Aktionspotentials von Katzen-Papillarmuskeln, daß (-)-Verapamil hauptsächlich den langsamen Ca^{++} -Einstrom, (+)-Verapamil jedoch den schnellen Na^{+} -Einwärtskanal im Sinne einer Stereospezifität hemmt.

Wenn die Wirkung des (+)-Verapamils am Herzen ~~bedingungslos~~ auf einer Blockade des schnellen Na^+ -Einwärtsstroms beruht, so sollte dieses Enantiomer keinen negativ chronotropen Effekt bei Versuchsobjekten zeigen, deren schneller Na^+ -Kanal funktionell inaktiv ist. ~~Derart~~ Versuchsobjekte sind isolierte kultivierte Herzmuskelzellen (McLean et al. 1974, McDonald u. Sachs 1974, Josephson u. Sperelakis, 1978, sowie Schrittmachergewebe, deren Aktionspotential nicht über Leitfähigkeitsänderungen im schnellen Na^+ -Kanal zustande kommen sollen (Pondier et al. 1973, Zipes u. Mendez 1973, Zipes u. Fisher 1974).

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen werden, besitzen jedoch beide Verapamil-Enantiomere negativ chronotrope und negativ inotrope Wirkungen an isolierten kultivierten Rattenherzzellen und isolierten Vorhöfen neugeborener Ratten. Somit müssen die Wirkungen der Enantiomere im Sinne einer Stereoselektivität diskutiert werden.

MATERIAL UND METHODE

MATERIAL

Inkubationslösungen:

Lösung 1:

Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung für die Untersuchungen an isolierten Vorhöfen neugeborener Ratten (Kaumann et al., 1975).

K a t i o n e n	(mVal/l)	A n i o n e n	(mVal/l)
-----------------	----------	---------------	----------

Na ⁺	140	Cl ⁻	98
K ⁺	5	HCO ₃ ⁻	29
Ca ⁺⁺	4,5	HPO ₄ ⁻⁻	2
Mg ⁺⁺	2	SO ₄	2

Fumarat	10 mM/l
---------	---------

L-Glutamat	5 mM/l
------------	--------

Glukose	10 mM/l
---------	---------

Pyruvat	5 mM/l
---------	--------

ETDA (Ethylenediamine tetraacetic acid, Di-Natrium-Salz)	0,04mM/l
---	----------

Entionisiertes, redestilliertes Wasser

Äquilibration mit 95% O₂ und 5% CO₂ (Carbogen) pH 7,2

Lösung 2:

Calcium-arme modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (Kaumann et al., 1975). Sie entspricht in ihrer Zusammensetzung Lösung 1, lediglich CaCl₂ wurde fortgelassen.

Zusätze:	Penicillin	250 000 U/l
	Streptomycin	100mg/l
	Phenolrot	
	(als Indikator)	10mg/l

Lösung 3:

Trypsin 2,5% in "modified Hanks balanced salt solution" (Flow Lab. 7-024 D), verdünnt 1:20 mit Lösung 2.

Lösung 4:

Kultivationsmedium: Waymouth's Medium MB 752/1 "modified without NaHCO_3 (Flow Lab. 2F-030D) (Waymouth 1959).

Zusätze: NaHCO_3	2,24 g/l
Penicillin	250 000 U/l
Streptomycin	100mg/l
Phenolrot (als Indikator)	10mg/l

10% Pferdeserum: Horse Serum
Mycoplasma and Bacteriophage
screened (Flow Lab. 4 - 012D)

Substanzen:

Die Hydrochloride der Enantiomere (+) - und (-) - Verapamil stellte die Fa. Knoll AG.; Ludwigshafen/Rh freundlicherweise zur Verfügung.

Tetrodotoxin (TTX), ein spezifischer Blocker des schnellen Na^+ -Kanals (Dudel et al. 1967), ist ein Produkt der Fa. San-kyo (Tokyo) und wurde über die Fa. Boehringer - Mannheim (Best.Nr. 15 394) bezogen.

Die Verapamil-Stammlösungen wurden von beiden Enantiomeren in den Endkonzentrationen 10 μM , 100 μM und 1 mM mit bi-distilliertem Wasser angesetzt.

Seren und Trypsinlösungen wurden bei -20°C , die übrigen Medien und Substanzen bei $+4^\circ\text{C}$ gelagert.

Methode

Zellkultivation

(Kaumann et al., 1975). Für jede Zellkultivation entnahmen wir 10 bis 20 durch Genickbruch getöteten neugeborenen Ratten die Herzen. Durch mehrfaches Waschen mit Lösung 2 wurden die Erythrozyten aus den isolierten Herzen herausgespült. In der Ca^{++} -armen Lösung lockern sich die Zellkontakte des Muskelgewebes. Nach Abschluß der Präparation zerschnitten wir die Herzen in Stücke und überführten sie in Lösung 3, in der das Trypsin die Herzzellen aus ihrem Gewebeverband löst. Nach 10 min wurden die in Lösung 3 gelösten Zellen bei Raumtemperatur zentrifugiert (200 g, 10 min), während die verbleibenden Herzstücke neue Trypsinlösung erhielten. Das Zentrifugat mußte mehrfach in Waymouth-Kulturmedium (Lösung 4) aufgenommen werden und erneut abzentrifugiert werden, um das Trypsin auszuwaschen. Der Trypsinisierungsvorgang wiederholte sich bis zu 5 mal, wobei die Herzen vollständig aufgelöst wurden. Anschließend wurden die im Waymouth-Medium enthaltenen isolierten Einzelzellen durch ein Glasfilter (Schott, Mainz, G1) von restlichen Gewebeverbänden abgetrennt. Nach einem abschließenden Waschgang mit Lösung 4 konnten die Zellen in 25 cm² Falcon - Kulturgefäße in einer Zelldichte von etwa 5×10^5 Zellen/ml ausgesät werden. Bei 35°C ($\pm 1^\circ$), Wasserdampfsättigung und CO₂-Begasung, die den pH - Wert auf 7,2 konstant hielt, wuchsen die Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden am Boden der Kulturgefäße fest. Danach wurde das Kulturmedium (Lösung 4) erneuert, um restliche Erythrozyten, Zellbruchstücke und Stoffwechselprodukte auszuwaschen. Jeden 2. Tag wurde das Kulturmedium erneut gewechselt.

Registrierung der Zellkontraktionen

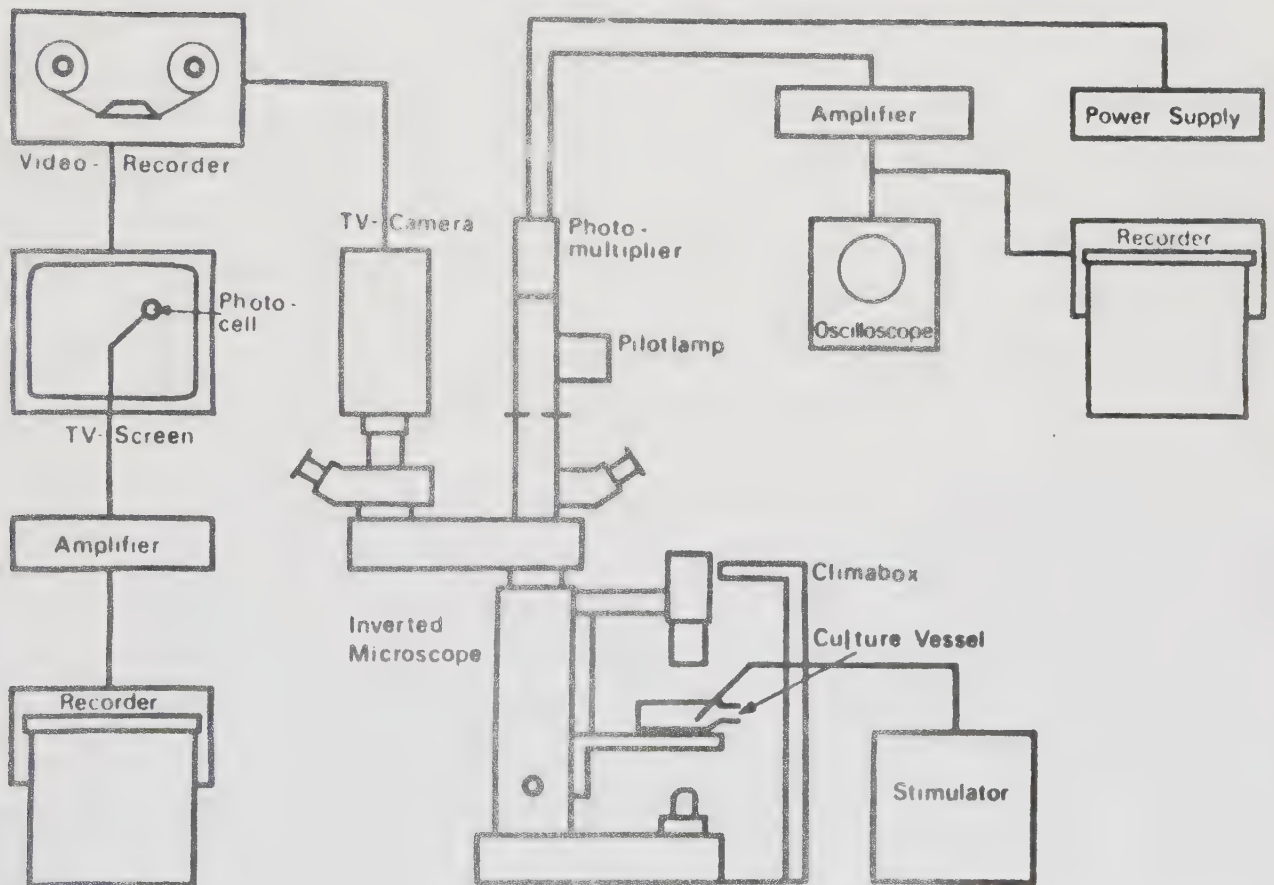
Die Untersuchungen an den kultivierten isolierten Herzmuskelzellen führten wir an einem Versuchsaufbau durch, den Abbildung 1 im Blockbild zusammenfasst.

Das Falcon-Kulturgefäß mit den gezüchteten, spontan schlagenden Herzzellen ist auf dem Kreutztisch eines Leitz-Diavert-Umkehrmikroskopes mechanisch fixiert. Das Mikroskop steht schwingungsfrei auf einem Wägetisch. Eine CO₂-Begasung hält den pH der Kultur konstant auf 7,2; ein regelbeheizter PVC-Arbeitskasten sorgt für eine konstante Temperatur von $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$. Das mikroskopische Abbild der Zellen wird von einer Fernsehkamera aufgenommen und über einen Monitor wiedergegeben. Ein parallelgeschalteter Videorekorder erlaubt es, den Versuchsablauf aufzuzeichnen, so daß mehrere im Bildbereich schlagende Zellen nacheinander ausgewertet werden können. Vom Bildschirm greift eine Photozelle die durch die Zuckung der schlagenden Herzmuskel - Einzelzelle verursachten Helligkeitsschwankungen ab, die nach elektrischer Verstärkung auf einem Schreiber registriert werden. Diesen Versuchsaufbau verwendeten auch Kaumann et al. (1977).

Durch Einbau eines von Kaufmann et al. (1969) beschriebenen photoelektrischen Systems wurden störungsfreiere Registrierungen der Kontraktionsabläufe möglich. In das mikroskopische Bild kann durch die Pilotlampe eine verstellbare Meßfeldblende eingespiegelt werden, deren Meßbereich so über die Zellgrenze einer spontan schlagenden Myocardzelle eingestellt wird, daß durch die Zellzuckung eine maximale Lichtintensitätsänderung im Meßfeldbereich auftritt. Diese Lichtschwankung wird durch Photomultiplier (Knott) und Verstärker in elektrische Signale umgewandelt, die auf Oszillograph und Schreiber registriert werden.

Abbildung 1

Einrichtung zur Registrierung von Zellkontraktionen
Erklärung der Funktionen im Text



Versuchsablauf

Vor Versuchsbeginn wurde bei der zu verwendenden Zellkultur das Kulturmedium (Lösung 4) gewechselt. Nach der Befestigung des Kulturgefäßes auf dem Mikroskop-Kreuztisch wurde in das Medium eine fixierte Kanüle eingetaucht, die über einen sterilen Plastik-Infusionsschlauch mit einer 20 ml Spritze verbunden war. Über dieses System konnte durch mehrmaliges Ansaugen und Ausspritzen von über der Hälfte des Mediums eine gute und schnelle Durchmischung mit der jeweils zugeführten Substanz erreicht werden. Da die Zellen am Boden des Kulturgefäßes festgewachsen waren, hielten sie dieser mechanischen Beanspruchung stand, ohne ihre Lage im Mikroskopbild zu verändern.

Es wurden nur solche Zellen zu Versuchen herangezogen, deren Spontanfrequenzen während einer 10-minütigen Vorregistrierung konstant blieben. Abweichungen von $\pm 5\%$ vom Mittelwert der Frequenz wurden toleriert. Um jede Dosis der Testsubstanzen über einem möglichst breiten Kontrollfrequenzintervall auswerten zu können, wurden bewußt langsamer und schneller schlagende Zellen gesucht. Die Gesamtheit der in den Versuchen registrierten Spontanfrequenzen unterliegt somit keiner Zufallsverteilung.

Die Testsubstanzen wurden mit 5 - bzw. 10 μ l Hamilton-Spritzen zugegeben. Durch das oben beschriebene wiederholte Mischen war eine gleichmäßige Verteilung gewährleistet. Das Auswaschen einer zugefügten Testsubstanz geschah durch vollständiges Absaugen des Mediums und anschließender Auffüllung mit frischem Medium. Dieser Vorgang wurde bis zu 3-mal innerhalb von 5 - 10 min wiederholt.

Isolierte Vorhöfe

Nach Dekapitation der neugeborenen Ratten wurden die Herzen schnell entnommen, mit Lösung 1 gewaschen und bei Raumtemperatur die rechten Vorhöfe abpräpariert. Die spontan schlagenden Vorhöfe spannten wir semi-isometrisch in Transducer ein,

wie sie Blinks (1965) beschrieben hat. Die Vorhöfe befanden sich in einem 50 ml - Bad in Lösung 1, dessen Temperatur auf $32,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ gehalten wurde. Die Widerstandsänderung des Transducersystems bei Spontankontraktion des Vorhofes wurde über eine Meßbrücke elektrisch verstärkt und auf einem Schreiber registriert.

Ergebnisse

Experimente an isolierten kultivierten Herzmuskel-Einzelnzellen

Spontanfrequenzen der Herzmuskelzellen

Bereits einen Tag nach der Aussaat beginnen in den Kulturen einzelne Zellen unregelmäßig zu schlagen. Am dritten Tag der Kultur schlagen mehr als die Hälfte aller Einzelzellen spontan und mit zumeist stabiler Frequenz. Zwischen dem 6. und 10. Tag entstehen schließlich dichte Zellrasen (monolayer). Um interzelluläre Beeinflussungen auszuschließen, haben wir in unseren Experimenten keine Monolayer-Kulturen verwendet.

Die vorgelegten Ergebnisse basieren auf Messungen an 97 Einzelzellen, die absichtlich über einen breiten Bereich von Spontanfrequenzen ausgewählt wurden. Die schnellste Zelle schlug mit 230 Schlägen/min, die langsamste mit 22 Schlägen/min. 3 Versuchsgruppen wurden gebildet:

- Versuchsgruppe 1: Untersuchungen mit (+)-Verapamil
mit oder ohne TTX (N=41)
- Versuchsgruppe 2: Untersuchungen mit (-)-Verapamil
mit oder ohne TTX (N=26)
- Versuchsgruppe 3: Untersuchungen zum Einfluß der
 Ca^{++} -Konzentration auf die Wirkung
der Verapamil-Enantiomere (N=30)

Tabelle 1 zeigt, daß für die verschiedenen Untersuchungen Zellen mit einem vergleichbar großen Bereich der Spontanfrequenzen benutzt wurden, jedoch wegen der bewußten Auswahl hoher und niedriger Spontanfrequenzen keine normalverteilten Kollektive: die erkennbare Zweigipfligkeit der Verteilungen ist rein artefiziell.

Tabelle 1

Verteilung der Spontanfrequenzen in den Versuchsgruppen.

Untersuchte Zellen $N = 97$

Klassen ($\sqrt{N}$) $k = 10$

Variationsbreite 208 Schläge / min

Klassenbreite 21 Schläge / min

k	k-Grenzen (Schläge/min)	Anzahl der Zellen			
		total	Gruppe 1	2	3
1	22 - 43	3	2	0	1
2	43 - 64	9	4	2	3
3	64 - 85	24	10	6	8
4	85 - 106	19	8	5	6
5	106 - 124	14	5	6	5
6	124 - 148	21	7	7	7
7	148 - 169	2	0	2	0
8	169 - 190	2	2	0	0
9	190 - 211	0	0	0	0
10	211 - 232	3	3	0	0

Positiv chronotroper Effekt von Ca^{++}

In der Versuchsgruppe 3 (Tabelle 1) führt eine Erhöhung des Ca^{++} -Gehalts im Kulturmedium ausgehend von 0.8 mM Ca^{++} auf 1.8 mM Ca^{++} bis zu 2.25 mM Ca^{++} zu einer Zunahme der Schlagfrequenz der kultivierten Einzelzellen (Tabelle 2).

Tabelle 2

Verteilung der Spontanfrequenzen bei Erhöhung des Ca^{++} -Gehalts im Kulturmedium (Versuchsgruppe 3 der Tabelle 1).

k	k-Grenzen (Schläge/min)	Ca^{++} -Gehalt (mM) :		
		0.8	1.8	2.25
1	22 - 43	1	0	0
2	43 - 64	3	1	0
3	64 - 85	8	1	0
4	85 - 106	6	4	1
5	106 - 124	5	3	4
6	124 - 148	7	7	4
7	148 - 169	0	6	5
8	169 - 190	0	4	3
9	190 - 211	0	1	1
10	211 - 232	0	0	0

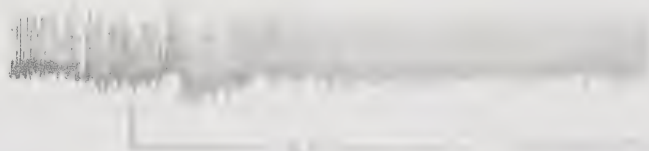
Von einer statistischen Mittelung wurde abgesehen, da die Populationen nicht normalverteilt sind. Der Sachverhalt geht ohnedies klar aus der Tabelle 2 hervor.

Reversible negativ chronotrope Wirkung von Verapamil-Enantiomere

Beide Verapamil-Enantiomere senken die Spontanfrequenz der Rattenherz-Einzelzellen. Nach Zugabe des Pharmaka mit frischem Kulturmedium sinkt die Spontanfrequenz der Zellen in weniger als 10 Minuten auf eine niedrige Spontanfrequenz. Abbildung 2 zeigt die Reversibilität anhand einer Originalaufzeichnung. (-)-Verapamil ($2 \times 10^{-7} \text{ M}$) senkt die beobachtete Zelle innerhalb von 10 Minuten unter gleichzeitiger Verminderung der Amplitude bis zum Stillstand der Spontanaktivität. Nach Auswaschen der Substanz mit frischem Kulturmedium kehrt die Spontanfrequenz und Amplitude nach 15 Minuten auf Ausgangswerte.

Abbildung 2 Wirkung von (-)-Verapamil auf die Spontanfrequenz der vierten Ratten-Herz-Zelle.

Kontrolle



200 nM

[-]-Verapamil

1 min



5 min

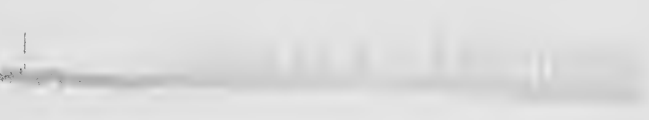


30 min



Auswaschen

1 min



15 min



In weiteren Experimenten konnte diese Reversibilität des negativ chronotropen Effekts für beide Verapamil-Enantiomere demonstriert werden. Tabelle 3 faßt die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 3

Reversible negativ chronotrope Wirkung der Verapamil-Enantiomere an Rattenherz-Einzelzellen.

Substanz	Konzentration (M)	Frequenz (Schläge/min)		
		vor Verapamil	nach Verapamil	nach Auswaschen
(-)-Verapamil	2×10^{-8}	74	67	80
		135	94	132
	8×10^{-8}	138	117	130
		130	45	100
	2×10^{-7}	95	0	91 ⁺)
		129	38	106
(+) -Verapamil	6×10^{-7}	106	39	101
		134	94	104
	2.4×10^{-7}	77	52	73
		90	75	84
	4×10^{-7}	70	45	93

⁺) Dieser Versuch entspricht Abbildung 2

Zeitliche Unterschiede der Gleichgewichtseinstellung für die negativ chronotropen und die negativ inotropen Effekte beider Verapamil-Enantiomere an Einzelzellen.

Bei dem in Abbildung 2 dargestellten Versuch fiel auf, daß die Kinetiken der negativ chronotropen und der negativ inotropen Verapamilwirkung verschieden sind. Abbildung 3 zeigt eine Originalregistrierung und deren Auswertung für ein Experiment mit 6×10^{-8} M (-)-Verapamil in Gegenwart von $31.3 \mu\text{M}$ TTX: während der halbmaximale negativ-chronotrope Effekt bereits nach 1.6 min eintritt, ist die halbmaximale negativ-inotrope Wirkung, gemessen an der Amplitudenhöhe, erst nach 5.5 min erreicht.

Alle derartigen Beobachtungen sind in Tabelle 4 zusammengefaßt: die Zeit $t_{1/2_{\text{freq}}}$ ist immer deutlich kürzer als die Zeit $t_{1/2_{\text{ampl}}}$.

Errechnet man die Quotienten aus den Halbwertszeiten für die Enantiomere, so erhält man im Mittel für

(+)-Verapamil $Q = 3.0$

(-)-Verapamil $Q = 2.5$

ohne einen signifikanten Unterschied. Beide Enantiomere verhalten sich somit gleichsinnig, allerdings in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen.

Abbildung 3

Negative chronotrope und negativ inotrope Effekte
von (-)-Verapamil in Gegenwart von TTX.
Erklärung im Text

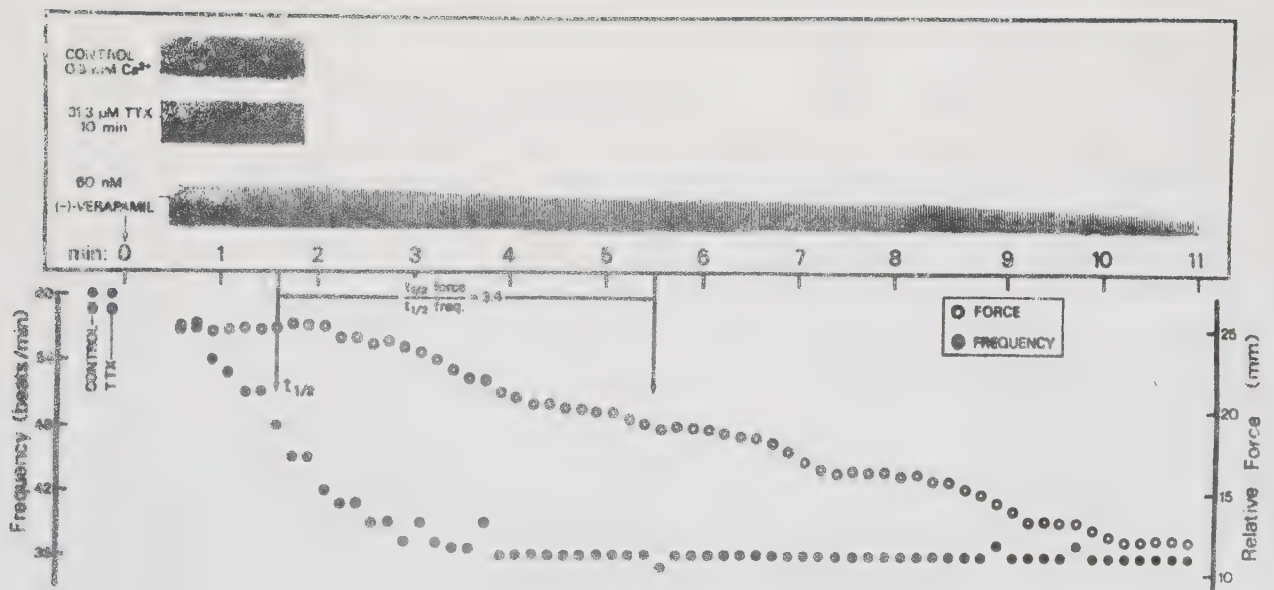


Tabelle 4

Halbwertszeiten für den negativ chronotropen ($t_{1/2_{\text{freq}}}$) und den negativ inotropen ($t_{1/2_{\text{ampl}}}$) Effekt beider Verapamil-Enantiomere bei verschiedenen Konzentrationen an Rattenherz-Einzelzellen.

Substanz	Konzentration (M)	$t_{1/2_{\text{freq}}}$ (min)	$t_{1/2_{\text{ampl}}}$ (min)	Quotient
(+) - Verapamil	6×10^{-7}	0.2	0.5	2.5
		0.3	0.8	2.7
		0.4	1.7	4.3
		0.7	3.3	4.7
		1.6	3.2	2.0
	1.2×10^{-6}	0.6	1.1	1.8
(-) - Verapamil	6×10^{-8}	2.7	3.7	1.4
		2.5	3.2	1.3
		1.6	5.5	3.4 ⁺
	1.2×10^{-7}	0.2	0.5	2.5
		0.3	1.1	3.7
		1.3	7.0	5.4
		2.5	3.2	1.3
	2×10^{-7}	0.4	0.6	1.5
		1.3	3.0	2.3
	4×10^{-7}	0.4	0.7	1.8

Von 18 Experimenten konnten 16 ausgewertet werden.

Mittelwert der Quotienten $t_{1/2_{\text{ampl}}} / t_{1/2_{\text{freq}}}$:

(+) - Verapamil $Q = 3.0$ (N=6)

(-) - Verapamil $Q = 2.5$ (N=10)

⁺) Versuch der Abbildung 3

Dosis-Wirkungskurven für die Verapamil- Enantiomere an Rattenherz-Einzelzellen

Prozentuale Normierung der Frequenzeffekte für spontan schlagende Einzelzellen

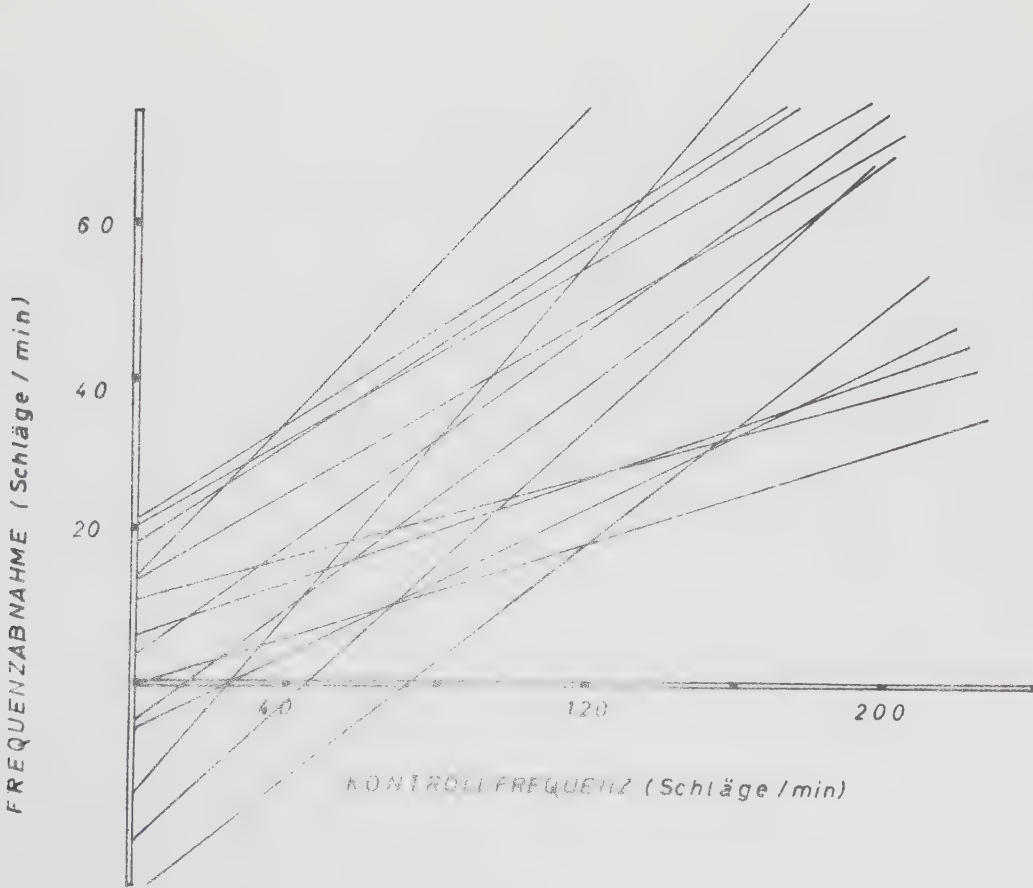
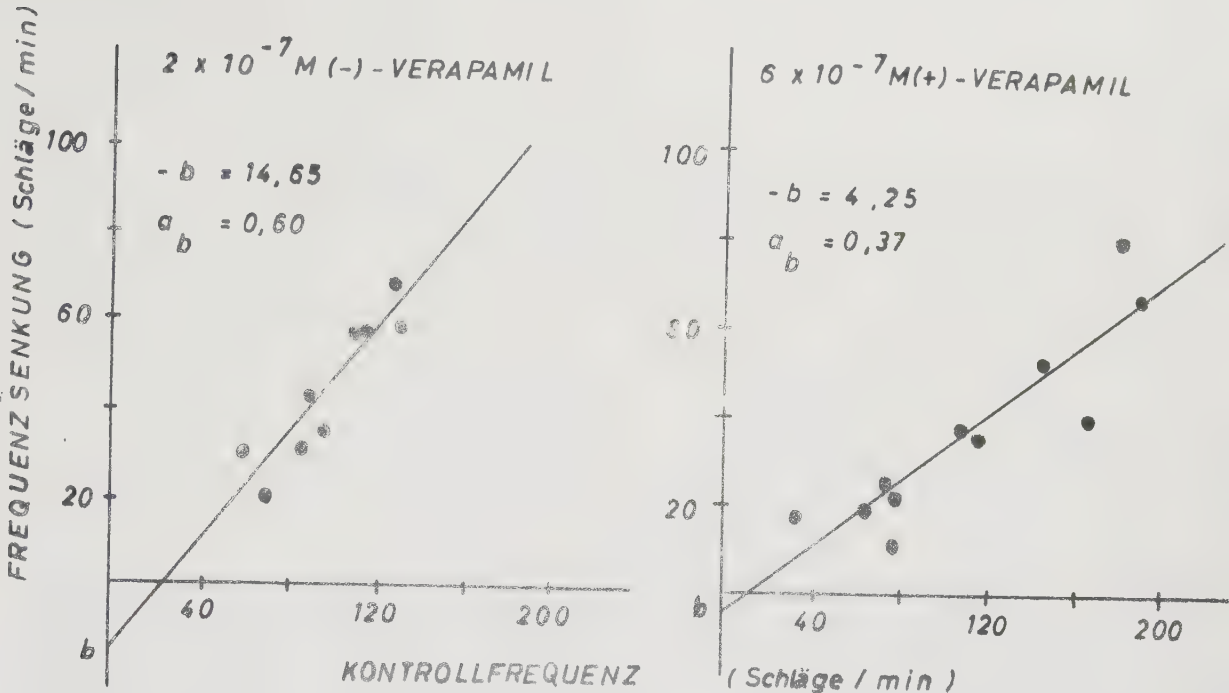
Ein Vergleich der Wirkungen beider Verapamil-Enantiomere kann nur mithilfe exakter Dosis-Wirkungs-Kurven erreicht werden. Für die dabei übliche und für Schrittmachergewebe gültige prozentuale Normierung ist Voraussetzung, daß die relative Frequenzabnahme proportional und unabhängig von der Ausgangsfrequenz der Zelle für eine bestimmte Wirkstoff-Konzentration korreliert. Derartige Korrelationen wurden für solche Verapamilkonzentrationen genauer untersucht, für die Meßwerte von Zellkollektiven mit einem Intervall der Ausgangsfrequenzen von mehr als 60 Schlägen/min zur Verfügung standen.

Zu beantworten war die Frage:

Ist die Frequenzsenkung unter einer bestimmten Verapamilkonzentration linear mit der Ausgangsfrequenz korreliert ?

Beispiele für das Vorgehen zeigt Abbildung 4, eine Zusammenfassung aller Ergebnisse der Korrelationsrechnungen Abbildung 5.

Zur prozentualen Normierung der Dosis-Effekt-Kurven.
Erklärung im Text



Für die lineare Regression

$$y = a_b x + b \quad (1)$$

wurde zunächst geprüft, ob eine signifikante Korrelation zwischen Schlagfrequenz-abnahme und Kontrollfrequenz der Zellen besteht. Signifikante Korrelationen ergaben sich für die Bedingungen:

6×10^{-8} M (+)-Verapamil	0.8 mM Ca^{++}
6×10^{-7} M (+)-Verapamil	1.8 mM Ca^{++}
2×10^{-7} M (-)-Verapamil	0.8 und 1.8 mM Ca^{++}

mit p kleiner 0.05

Für 9 weitere Verapamilkonzentrationen ergaben sich Korrelationen von p kleiner 0.2 ; auch für diese Konzentrationen ließ sich zumindest kein Trend zu anderen als linearen Regressionen nachweisen (N = 5-12 Zellen).

Die angestrebte prozentuale Normierung sollte der Bedingung

$$y = a_0 x \quad b = 0 \quad (2)$$

genügen. Der rechnerische Mittelwert aller Ordinaten-schnittpunkte (b) der Abbildung 5 beträgt - 1.4 Schläge/min und stimmt bei einem Gesamtmittelwert des Kurvenkollektivs $\bar{Y} = 38.0$ gut mit dem Erwartungswert $b = 0$ überein. Dabei liegen sämtliche Koordinatennullpunkte innerhalb des 95% - Konfidenzintervalls der jeweiligen Regressionsgeraden. Damit darf eine lineare Regression gemäß Gleichung (2) angenommen werden. Eine prozentuale Normierung der Dosiswirkungskurven ist somit statthaft.

Definition der Vergleichsparameter:

Inhibitory concentration (IC)

Isomerischer Quotient

Dosis-Effekt-Kurven der Verapamil-Enantiomere können kumulativ bei beliebigen Konzentrationen der Pharmaka aufgenommen werden. Für den Vergleich der Wirkungen müssen dann durch Interpolation diejenigen "Hemmkonzentrationen" (inhibitory concentration, IC) ermittelt werden, welche eine bestimmte prozentuale Verminderung der Spontanfrequenz erzeugen. In den im Folgenden besprochenen Experimenten stellte sich heraus, daß die Hemmkonzentrationen für eine Frequenzverminderung um 40 % - abgekürzt: IC_{40} - die am besten reproduzierbaren und zugleich am stärksten differierenden Werte für die Verapamil-Enantiomeren liefert.

Für den Wirkungsvergleich bildet man dann den Quotienten der IC_{40} -Werte für die Enantiomeren, den "Isomerischen Quotienten" (3).

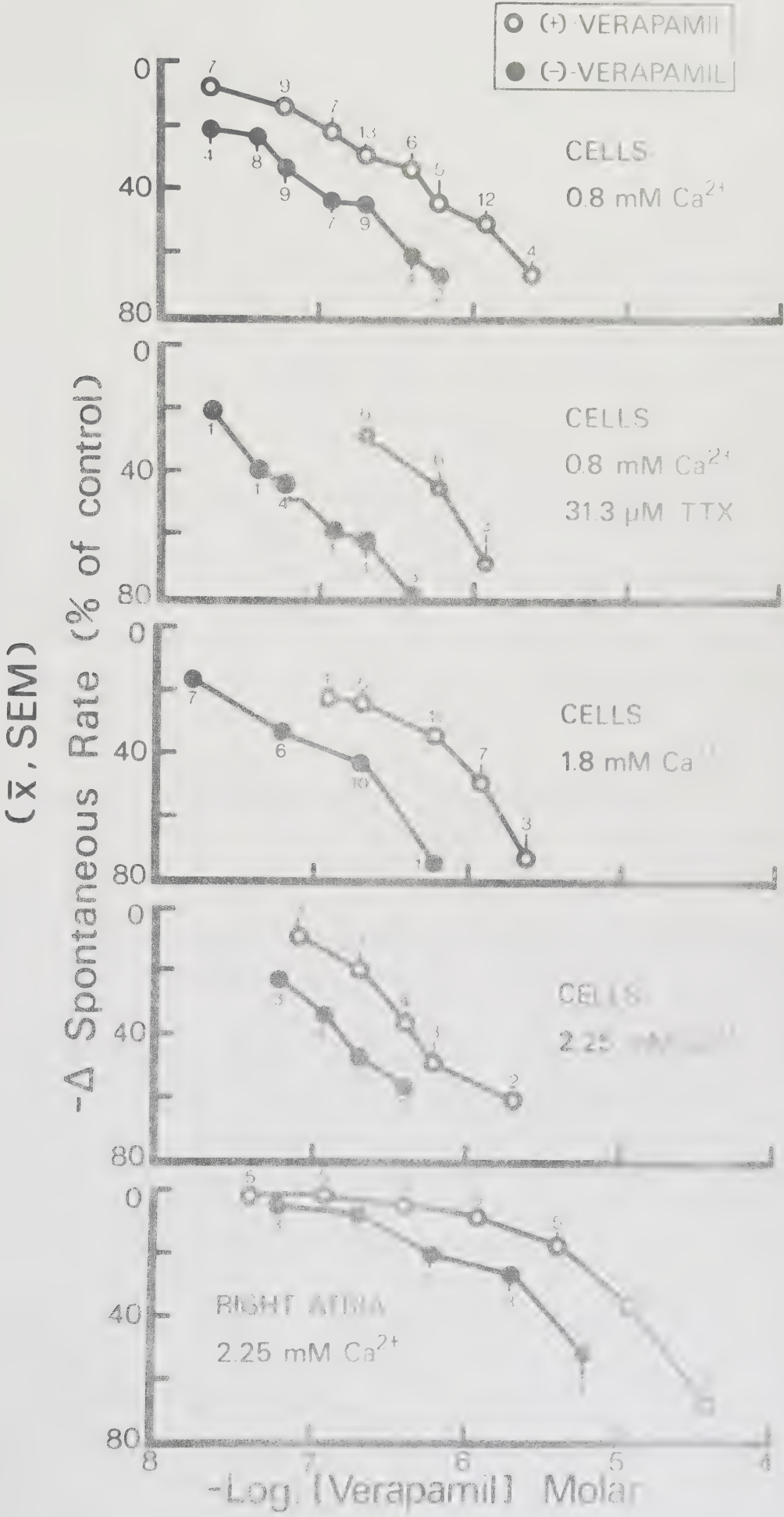
$$IQ_{40} = \frac{IC_{40}((+)\text{-Verapamil})}{IC_{40}((-)\text{-Verapamil})} \quad (3)$$

Diese Größen werden vergleichsweise sowohl für die Wirkung der Enantiomere an Einzelzellen wie am Schrittmachergewebe rechter Vorhöfe berechnet.

In einzelnen Fällen werden auch die Logarithmen der IC_{40} und des IQ_{40} zur Darstellung herangezogen.

Signifikante Unterschiede der normierten Vergleichsparameter konnten mit Student's t-Test geprüft werden.

Abbildung 6 Dosis-Wirkungs-Kurven der Verapamil-Enantiomere



Dosis-Wirkungskurven des negativ chronotropen
Effekts der Verapamil-Enantiomere an
Rattenherz-Einzelzellen

Abbildung 6(a-d) zeigt die gemittelten Dosis-Wirkungs-Kurven für die Frequenzabnahme von Rattenherz-Einzelzellen bei einer Reihe von willkürlich gewählten Verapamilkonzentrationen. Die Zahl der untersuchten Zellen ist für jeden Kurvenpunkt angegeben. Zumeist wurden diese Experimente mit kumulativer Substanzzugabe ausgeführt.

Beide Enantiomere senken die Frequenz spontan schlagender Einzelzellen in Abhängigkeit von der Dosis. (-)-Verapamil ist stets die stärker negativ chronotrop wirksame Substanz. Die absoluten und relativen Effekte beider Enantiomere zeigen dabei in dem von uns untersuchten Bereich keine signifikante Abhängigkeit vom Ca^{++} -Gehalt des Mediums (0.8 - 2.25 mM Ca^{++}).

Tabelle 5 gibt eine Zusammenstellung der Kenngrößen.

Effekte der Verapamil-Enantiomere in Gegenwart
von Tetrodotoxin (TTX)

Die Erregungsbildung spontan schlagender Rattenherz-Einzelzellen soll, wie eingangs erwähnt, unabhängig von der Funktion eines schnellen Na^+ -Kanals sein. Dies geht bereits aus dem in Abbildung 3 gezeigten Experiment hervor. Eine Reihe weiterer Versuche mit einer extrem hohen Dosis TTX (31.3 μM) sollte diesen Befund sichern.

Der Mittelteil der Tabelle 5 zeigt die aus den Dosis-wirkungs-Kurven ermittelten Kenngrößen in Gegenwart von TTX. Tabelle 6 zeigt weiter, daß TTX die spontane Erregungsbildung nicht beeinflusst.

Tabelle 5

IC₄₀ und IQ₄₀ für die negativ chronotrope Wirkung der Verapamil-Enantiomere an Rattenherz-Einzelzellen bei unterschiedlicher Ca⁺⁺-Konzentration und unter Tetrodotoxin (TTX)

Ca ⁺⁺ (mM)	0.8	0.8	2.25
TTX	-	+	-
Enantiomer	(+)	(-)	(+)
N	8	10	4
-log IC ₄₀	6.47	6.96	6.36
± SD	0.28	0.19	0.19
± SEM	0.10	0.06	0.08
IC ₄₀ (M)	3.4 x 10 ⁻⁷	1.1 x 10 ⁻⁷	4.4 x 10 ⁻⁷
IQ ₄₀	3.1	6.0	2.9

Tabelle 6

Spontanfrequenzen von Rattenherz-Einzelzellen vor und nach Zugabe von 31.3 μ M Tetrodotoxin (TTX)

Spontanfrequenz (Schläge/min)	nach Zugabe von TTX
52	50
70	72
80	72
85	87
105	104
130	138
60	60
75	78
85	85
94	90
117	114

Die erhaltenen Dosis-Wirkungskurven in Gegenwart von TTX zeigt weiter die Abbildung 6(b). Zudem zeigt das Experiment der Abbildung 3, daß auch die Amplitudenhöhe der Spontan-
kontraktionen sich unter Einfluß von TTX nicht ändert.

Faßt man diese Befunde unter Beachtung der Meßwert-streuungen zusammen, so besteht kein Unterschied im Verlauf der Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Verapamil-Enantiomere unter dem Einfluß von TTX. Insbesondere ist die beobachtete Wirkung von (+)-Verapamil an diesem Versuchsobjekt unabhängig vom schnellen Na^+ -Kanal.

Experimente an isolierten rechten Vorhöfen neugeborener Ratten

Auch die Erregungsbildung im intakten Schrittmacher-
gewebe soll - wie eingangs erwähnt - unabhängig vom
schnellen Na^+ -Kanal verlaufen. Es lag daher nahe, die
bisherigen Ergebnisse über die negativ chronotrope
Wirkung der Verapamil-Enantiomere, insbesondere des
(+)-Verapamils, mit der Wirkung auf isolierte rechte
Vorhöfe neugeborener Ratten zu vergleichen.

Spontanfrequenzen der Vorhöfe

Die Vergleichsuntersuchungen führten wir an 11 Vorhöfen
aus. Tabelle 7 gibt deren Spontanfrequenzen wieder.

Tabelle 7

Spontanfrequenzen isolierter rechter Vorhöfe von
neugeborenen Ratten, unterteilt nach Versuchsgruppen

Untersuchungen mit	
(-)-Verapamil	(-)-Verapamil
165	131
177	142
181	85
191	182
202	187
207	

Negativ chronotroper Effekt der Verapamil- Enantiomere an isolierten Vorhöfen

In Abbildung 6(e) sind die Dosis-Wirkungs-Kurven für die mittlere prozentuale Frequenzabnahme der Vorhöfe unter willkürlich gewählten Konzentrationen beider Verapamil-Enantiomere dargestellt. Beide Enantiomere wirken negativ chronotrop. (-)-Verapamil ist auch an Vorhöfen die stärker negativ chronotrop wirksame Substanz. Um den gleichen relativen Frequenzabfall wie an isolierten Einzelzellen zu erzielen, sind jedoch an den Vorhöfen wesentlich höhere Konzentrationen beider Enantiomere notwendig. Die Berechnung der Kenngrößen IC_{40} und IQ_{40} aus der Interpolation der Dosis-Wirkungskurven zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8

IC_{40} und IQ_{40} für die negativ chronotrope Wirkung der Verapamil-Enantiomere an isolierten rechten Vorhöfen neugeborener Ratten (Ca^{++} -Konzentration: 2.25 mM)

	(+)-Verapamil	(-)-Verapamil
N	4	4
$-\log IC_{40}$	4.97	5.56
$\pm$ SD	0.17	0.23
$\pm$ SEM	0.09	0.12
IC_{40} (M)	1.1×10^{-5}	2.8×10^{-6}
IQ_{40}	3.9	

Die Wirkungsunterschiede der Enantiomeren an Vorhöfen sind signifikant verschieden.

Diskussion

Zusammenfassend kann das Ergebnis unserer Untersuchungen zunächst die bekannten negativ chronotropen Wirkungen der Verapamil-Enantiomere für isolierte rechte Vorhöfe neugeborener Ratten bestätigen und für die isolierte kultivierte Rattenherz-Einzelzelle deutlich belegen. Die Einwirkung von Verapamil führt nicht zu irreversiblen intrazellulären oder zellmembranären Veränderungen, denn die Effekte beider Enantiomere sind nach Auswaschen der Substanzen voll reversibel.

Die negativ chronotrope Wirkung des (-)-Verapamil ist sowohl an kultivierten Herzzellen (Tabelle 5) als auch an isolierten Vorhöfen neugeborener Ratten (Tabelle 8) 3 - 4 mal stärker als das (+)-Verapamil, unabhängig von den Absolutkonzentrationen. Abbildung 7 verdeutlicht diesen Sachverhalt.

Ganz ähnliche isomerische Quotienten fanden Kaumann u. Serur (1975) an Hundeherzen, ebenso Raschack (1976), sowie Kaumann u. Mannhold (1976, unveröffentlicht) an spontan schlagenden Katzenvorhöfen. Auch für die Hemmung der Kalium-Kontraktur des isolierten Frosch-Skelettmuskels durch die Verapamil-Enantiomere zeigten Kaumann u. Uchitel (1976) isomerische Quotienten, die mit unseren Werten übereinstimmen.

Beide Verapamil-Enantiomere sind am isolierten Vorhof etwa 25 mal weniger wirksam als an der isolierten Zelle. Dies deutet darauf hin, daß im exzidierten Gewebe die Verfügbarkeit der Substanz in der Biophase der Schrittmacherzelle erheblich vermindert ist. Hier wäre eine mögliche Aufnahme der Pharmaka in Bindegewebszellen oder Fettzellen zu diskutieren.

Abbildung 7

Vergleich der Hemmkonzentrationen IC_{40} der Verapamil-Enantiomere für die Versuchsobjekte Zelle und Vorhof

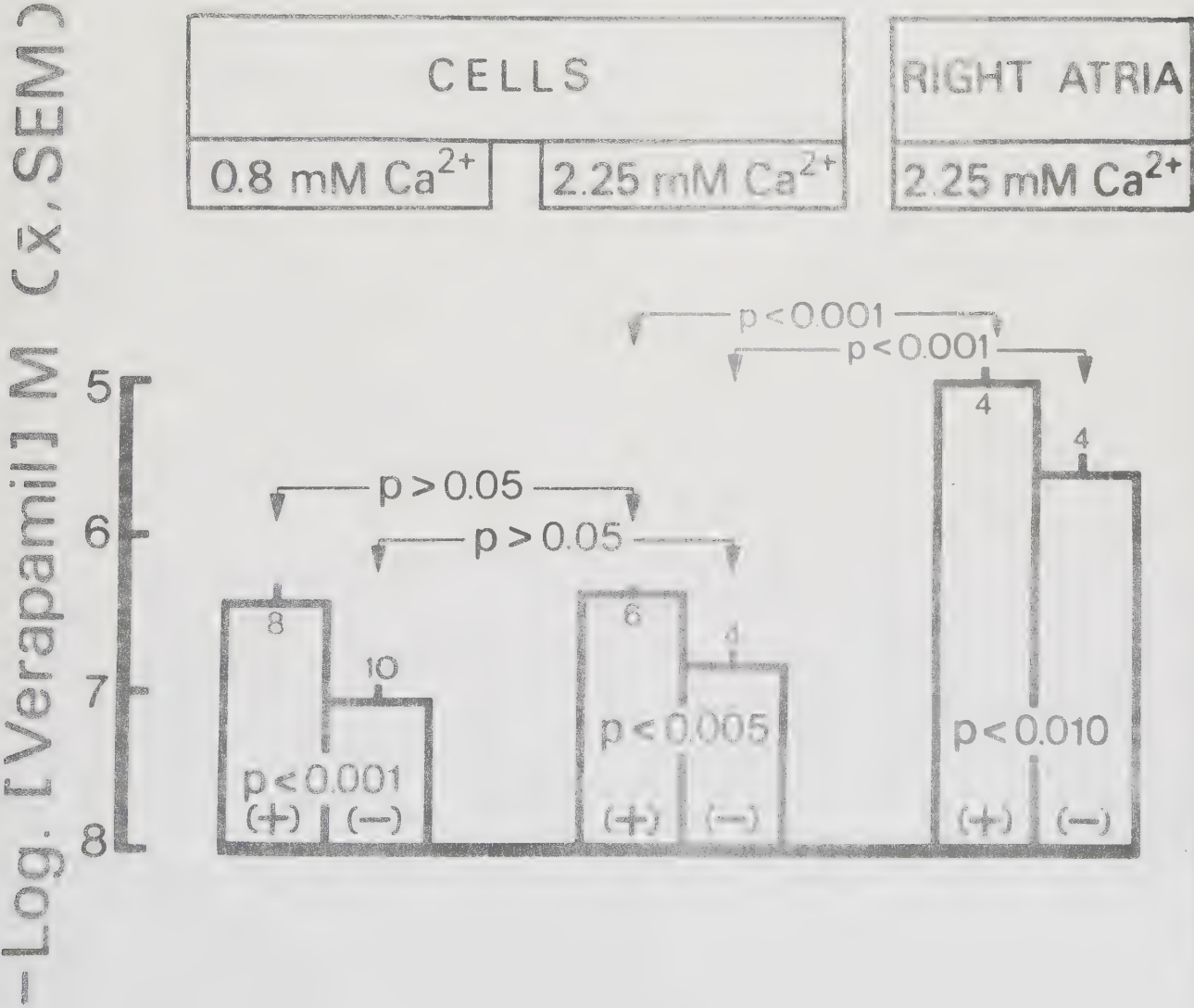


Tabelle 9 zeigt den Vergleich der Hemmkonzentrationen für unsere beiden Versuchsobjekte Zelle und Vorhof.

Tabelle 9

Vergleich der Hemmkonzentrationen IC_{40} der Verapamil-Enantiomere an isolierten kultivierten Herzzellen und rechten Vorhöfen neugeborener Ratten

Verapamil-Enantiomer		(+)	(-)
(1)	IC_{40} Zelle (2.25 mM Ca^{++})	12.1	11.5
	IC_{40} Zelle (0.8 mM Ca^{++})		
(2)	IC_{40} Vorhof	1	2.5
	IC_{40} Zelle (0.8 mM Ca^{++})		
(3)	IC_{40} Vorhof	24.8	18.2
	IC_{40} Zelle (2.25 mM Ca^{++})		

Dieser Vergleich bestätigt, daß die isolierte kultivierte Herzmuskelzelle für pharmakodynamische Untersuchungen ein besonders geeignetes Modell darstellt, insbesondere dann, wenn die Frage nach der effektiven Wirkkonzentration einer Substanz unmittelbar an der reaktiven Zelle interessiert. Denn hier ist die Aufnahme und Speicherung der Wirksubstanz in Gewebeteile, die nicht an der pharmakologischen Wirkung beteiligt sind, faktisch ausgeschlossen.

Beide Verapamil-Enantiomere wirken auch in Gegenwart von Tetrodotoxin an den kultivierten Ratten-Herzzellen negativ chronotrop und negativ inotrop. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Experimenten ohne Zugabe von TTX konnte nicht festgestellt werden (Tabelle 5).

Tetrodotoxin blockiert spezifisch den schnellen Na^+ -Einwärtskanal erregbarer Zellmembranen (Dudel et al. 1967). Da TTX weder die Spontanfrequenz noch die Kontraktionsamplitude kultivierter Ratten-Herzzellen beeinflusst, wie Abbildung 3 und Tabelle 6 zeigen, kann an der Bildung der Aktionspotentiale dieser Zellen kein schneller Na^+ -Kanal beteiligt sein. Gleiche Beobachtungen machten McLean et al. (1974) und McDonald u. Sachs (1975) an Hühner-Herzzellen sowie McCall (1976, 1978) an Ratten-Herzzellen. Generell scheint an kultivierten Einzelzellen der schnelle Na^+ -Kanal entweder gar nicht ausgebildet oder durch die Zellpräparation inaktiviert.

Unsere Befunde zwingen zu dem Schluß, daß beide Verapamil-Enantiomere an diesem Objekt ihre negativ chronotrope Wirkung unabhängig von einem schnellen Na^+ -Kanal ausüben. Die von Kaufmann et al. (1974) und von Bayer et al. (1975) aus elektrophysiologischen Daten beschriebene stereospezifische Wirkung des (+)-Verapamils auf den schnellen Na^+ -Kanal kommt an diesem Objekt nicht zum Tragen, da eben dieser Kanal nicht verfügbar ist.

Untersuchungen an verschiedenen Schrittmachergeweben haben deutlich gezeigt, daß der Aufstrich des Aktionspotentials der Schrittmacherzellen wesentlich über Leitfähigkeitsänderungen des langsamen Membran-Einwärtskanals und dessen Ladungsträger Ca^{++} oder $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^+$ zustande kommt (Rougier et al. 1969, Zipes u. Mendez 1973). Diesen langsamen Kanal passieren je nach Tierart entweder nur Ca^{++} -Ionen (Hund, Katze, Schaf) oder Ca^{++} - und Na^+ -Ionen (Meerschweinchen, Ratte, Huhn, Frosch) (Trautwein 1973, Reuter u. Beeler 1969, Besséau u. Gargouil 1969, Léoty 1974). Direkte Messungen der Ca^{++} - und Na^+ -Ströme im voltage-clamp-Experiment an Katzentrabekeln zeigen, daß Verapamil die Ca^{++} -Leitfähigkeit der Membran und damit den transitorischen Ca^{++} -Strom erheblich senkt (Kohlhardt et al. 1972). Das gleiche gilt für den $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^+$ -Strom

an kultivierten Hühner-Herzzellen (Shigenobu et al. 1974, McLean et al. 1974, Josephson u. Sperelakis 1978). Durch Erhöhung der extrazellulären Ca^{++} -Konzentration konnten wir - im Gegensatz zu McCall (1976) - die Frequenz der spontan schlagenden Rattenherzzellen steigern (Tabelle 2). Im Bereich extrazellulärer Ca^{++} -Konzentrationen zwischen 0.8 und 2.25 mM stellten wir eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit fest, wie sie Seifen et al. (1964) am Kaninchenvorhof gefunden haben. Nach diesen Autoren resultiert die Frequenzsteigerung durch Ca^{++} aus dem Anstieg der Steilheit der diastolischen Depolarisation.

In unseren Experimenten senkten beide Verapamil-Enantiomere die Schlagfrequenz der Herzzellen unabhängig vom extrazellulären Ca^{++} -Gehalt mit gleicher IC_{40} . Dies läßt vermuten, daß an der isolierten kultivierten Herzzelle die negativ chronotrope Wirkung der Verapamil-Enantiomere nicht über eine Blockade des langsamen Ca^{++} -Einwärtsstromes erfolgt. Der ursprünglichen These von Fleckenstein et al. (1968, 1969) und Kohlhardt et al. (1972), daß Verapamil lediglich den langsamen Ca^{++} -Einwärtsstrom hemmt, ist verschiedentlich widersprochen worden (s. Bayer et al. 1975).

So müssen andere Wirkungsmechanismen für den negativ-chronotropen Effekt des Verapamils diskutiert werden. McCall (1976) fand eine dosisabhängige Senkung der Spontanfrequenz kultivierter Ratten-Herzzellen durch racemisches Verapamil in recht guter Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen und konnte die Frequenzabnahme eng mit der Abnahme des Na^+ -Influx über den langsamen $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^+$ -Kanal korrelieren. Weiter zeigt McCall (1978), daß nur ein Teil dieses Na^+ -Stromes durch Verapamil beeinflusst wird, der gleichzeitig sensitiv für Lignocain ist, während Procainamid darüberhinaus den für Verapamil nicht sensitiven Anteil des langsamen Na^+ -Stroms blockiert. Ähnliche Experimente im hiesigen Labor zur Messung des Na^+ -Stroms mit ^{24}Na mißlingen bisher wegen der hohen

Adsorption von ^{24}Na an das Material der Zellkultur-gefäße.

Ein anderer Angriffspunkt des Verapamils und seines Derivats D 600 ist die von Okada u. Konishi(1975) und von Kass u. Tsien(1975) beschriebene Verzögerung der Aktivierung des K^+ -Auswärtsstroms. Die negativ chronotrope Wirkung entstünde dann durch Verzögerung der Repolarisation und eine entsprechende Verlängerung des Aktionspotentials (Bayer et al. 1975). Auch an isolierten Neuronen der Schnecke *Helix pomatia* beschrieben Kostyuk et al.(1975) eine Verzögerung des K^+ -Ausstroms.

Aus unseren Ergebnissen bleibt zu schließen, daß weder der schnelle Na^+ -Kanal noch der langsame Ca^{++} -Einwärtsstrom den Angriffspunkt der Verapamil-Enantiomere an den hier untersuchten Schrittmachern darstellt, sich also die Hemmwirkung grundsätzlich von den Effekten am Katzenpapillarmuskel unterscheidet. Im Gegensatz zu der beschriebenen Stereospezifität der Effekte am Katzenpapillarmuskel erfolgt die Hemmung hier - gleich, ob über den langsamen Na^+ -Einstrom oder den K^+ -Ausstrom - jedenfalls stereoselektiv.

Völlig offen muß die Deutung der negativ inotropen Wirkungen der Verapamil-Enantiomere an der isolierten Herzmuskelzelle bleiben. Auffällig ist, daß die negativ inotrope Wirkung wesentlich langsamer eintritt als der negativ chronotrope Effekt(Tabelle 4). Das kann darauf hindeuten, daß die negative Inotropie über zellinterne Wirkorte verläuft, wobei vielleicht Verschiebungen in der Kompartimentierung des kontraktionswirksamen Ca^{++} im Bereich der Mitochondrien und des allerdings in Kulturzellen nur schwach ausgeprägten sarkoplasmatischen Retikulums zu diskutieren wären.

Für den Beweis einer anderen These reichen die vorliegenden Untersuchungen nicht aus, der These nämlich, daß die primäre Frequenzverminderung sekundär zur Verminderung des Ca^{++} -Einwärtsstroms und weiter zur Verminderung der Sequestration ausschüttbaren Calciums über den von der Membranspannung abhängigen Transportschritt im sarkoplasmatischen Retikulum führt. Für den Beweis dieser These wären Experimente mit externer frequenter Stimulation der Herzzellen notwendig, die aus technischen Gründen im Rahmen dieser Untersuchung noch nicht durchgeführt werden konnten.

Literaturverzeichnis

Baker, P.F.; Meves, H.; Ridway, E.B.

Effects of manganese and other agents on the calcium uptake that follows depolarisation of squid axons.

J.Physiol.(Lond.) 231, 511-526 (1973)

Bassingthwaighe, J.B.; Fry, C.H.; McGuigan, J.A.

Relationship between internal calcium and outward current in mammalian ventricular muscle; a mechanism for the control of the action potential duration?

J.Physiol. (Lond.) 262, 15-37 (1975)

Bayer, R.; Kalusche, D.; Kaufmann, R.; Mannhold, R.

Inotropic and electrophysiological actions of Verapamil and D 600 in mammalian myocardium: III. Effects of optical isomers on transmembrane action potentials.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharm. 290, 81-97 (1975)

Bayer, R.; Kaufmann, R.; Mannhold, R.

Inotropic and electrophysiological actions of Verapamil and D 600 in mammalian myocardium: II. Pattern of inotropic effects of the optical isomers.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharm. 290 69-80 (1975)

Besseau, A.; Gargouil, Y.M.

Ionic currents in rat ventricular heart fibres: Voltage clamp experiments using double sucrose - gap technique.

J.Physiol. 204 95-96 (1969)

Blinks, J.R.

Convenient apparatus for recording contraction of isolated heart muscle.

J.Appl.Physiol. 20 755-757 (1965)

Chiarandini, D.J.; Bentley, P.J.

The effects of Verapamil on metabolism and contractility of the toad skeletal muscle.

J.Pharmacol.Exp.Ther. 186 52-59 (1973)

Cranefield, P.F.; Aronson, R.S.; Wit, A.L.

Effect of Verapamil on the normal action potential and on a calcium-dependent slow response of canine cardiac Purkinje fibers.

Circ.Res. 34 204-213 (1974)

Dudel, J.; Peper, K.; Rudel, R.; Trautwein, W.

Effect of Tetrodotoxin on the membrane current in the cardiac muscle (Purkinje fibers).

Pflügers Arch.Eur.J.Physiol. 295 213-226 (1967)

Fleckenstein, A.; Döring, H.J.; Kammermeier, H.

Einfluß von β -Rezeptorenblockern und verwandten Substanzen auf Erregung, Kontraktion und Energiestoffwechsel der Myocardfaser.

Klin.Wschr. 46 343-351 (1964)

Fleckenstein, A.; Grün, G.; Tritthart, H.; Byon, K.; Herding, P.

Uterus-Relaxation durch hochaktive Ca^{2+} -antagonistische Hemmstoffe der elektro-mechanischen Kopplung wie Isoptin, Substanz D 600 und Segontin.

Klin.Wschr. 49 32-41 (1971)

Fleckenstein, A.; Tritthart, H.; Fleckenstein, B.; Herbst, A.; Grün, G.

Eine neue Gruppe kompetitiver Ca^{2+} -Antagonisten (Iproveratril, D 600, Prenylamin) mit starken Hemmeffekten auf die elektro-mechanische Koppelung im Warmblütermyocard.

Pflügers Arch.Physiol. 307 R25 (1969)

Haas, H.; Härtfelder, G.

Alpha-isopropyl-alpha ((N-methyl-N-homoveratryl)-gamma-aminopropyl)-3,4-dimethoxyphenylacetonitril, eine Substanz mit coronargefäß-erweiternden Eigenschaften.

Arzneimittel-Forsch., 12 549-558 (1962)

Haeusler, G.

Differential effect of Verapamil on excitation-contraction coupling in smooth muscle and on excitation-secretion coupling in adrenergic nerve terminals.

J.Pharm.Exp.Ther. 180 672-682 (1972)

Josephson, I.; Sperelakis, N.:

5'-Guanylimidodiphosphate stimulation of slow Ca^{++} current in myocardial cells.

J.Mol.Cell.Cardiol. 10, 1157-1166 (1978)

Kass, R.S.; Tsien, R.W.

Multiple effects of calcium antagonists on plateau currents in cardiac Purkinje fibers.

J.Gen.Phys. 65 169-192 (1975)

Kaufmann, R.; Bayer, R.; Hennekes, R.; Kalusche, D.; Mannhold, R.

Antidysrhythmic and Ca-antagonistic actions of Verapamil and D 600: Stereoselectivity of optical isomers?

Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharm. 284 R 39 (1974)

Kaufmann, R.; Tritthart, H.; Rodenroth, S.; Rost, B.

Das mechanische und elektrische Verhalten isolierter embryonaler Herzmuskelzellen in Zellkulturen.

Pflügers Arch.Physiol. 311 25-49 (1969)

Kaufmann, R.; Tritthart, H.; Rost, B.; Fleckenstein, A.

Totale Entkoppelung der elektrischen und mechanischen Aktivität kultivierter embryonaler Herzmuskelzellen von Hühnchen durch Isoptin (Verapamil, Iproveratril).

Pflügers Arch.Physiol. 316 R12 (1970)

Kaumann, A.J.; Aramendia, P.

Prevention of ventricular fibrillation induced by coronary ligation.

J.Pharm.Exp.Ther. 164 326-332 (1968)

Kaumann, A.J.; Sotter, J.R.

Optical isomers of Verapamil on canine heart: Prevention of ventricular fibrillation induced by coronary artery occlusion, impaired atrio-ventricular conductances and negative inotropic and chronotropic effects.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharm. 291 347-358 (1975)

Kaumann, A.J.; Gabel, O.D.

Reversible inhibition of potassium contractures by optical isomers of Verapamil and D 600 on slow muscle fibers of the frog.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharm. 292 21-27 (1976)

Kaumann, A.J.; Wittmann, R.; Birnbaumer, L.; Hoppe, B.

Activation of myocardial β -adrenoceptors by the nitrogen-free low affinity ligand 3,4-dihydrocy- α -methylpropiofenone (U-0521).
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharm. 296 217-228 (1977)

Kaumann, A.J.; Wittmann, R.

Apparent equilibrium constant between β -adrenoceptors and a competitive antagonist on a cultured pacemaker cell of mammalian heart.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharm. 287 23-32 (1975)

Kohlhardt, M.; Bauer, B.; Krause, H.; Fleckenstein, A.

Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibers by the use of specific inhibitors.
Pflügers Arch.Physiol. 335 309-322 (1972)

Kostyuk, P.G.; Krishtal, O.A.; Doroshenko, P.A.

Outward currents in isolated snail neurons: III. Effect of Verapamil.
Comp.Biochem.Physiol. 51 C 269-275 (1975)

Léoty, C.

Membrane currents and activation of contraction in rat ventricular fibres.
J.Physiol. 239 237-249 (1974)

McCall, D.

Effect of Verapamil and of extracellular Ca and Na on contraction frequency of cultured heart cells.
J.Gen.Physiol. 68 537-549 (1976)

McCall, D.:

Responses of cultured heart cells to procainamide and lignocaine.
Cardiovascular Res. 12, 529-536 (1978)

McDonald, T.F.; Sachs, H.G.

Electrical activity in embryonic heart cell aggregates. Developmental aspects.
Pflügers Arch.Physiol. 354 151-164 (1975)

McLean, M.J.; Shigenobu, K.; Sperelakis

Two pharmacological types of cardiac slow Na-channels as distinguished by Verapamil.
Europ.J.Pharm. 26 379-382 (1974)

Melville, K.I.; Shister, H.E.; Hug, S

Iproveratril: Experimental data on coronary dilatation and antiarrhythmic action.
Canad.Med.Ass.J. 90 761-770 (1964)

Okada, T.; Konishi, T.

Effects of Verapamil on SA and AV nodal action potentials in the isolated rabbit heart.
Jap.Circ.J. 39 913-917 (1975)

Raschak, M.

Relationship of antiarrhythmic to inotropic activity and antiarrhythmic qualities of the optical isomers of Verapamil.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharm. 295 285-291 (1976)

Reuter, H.; Beeler, G.W.

Calcium entry and activation of contraction in ventricular myocardial fibres
Science 163 399 (1969)

Reuter, H.; Beeler, G.W.; Gant, G.H.; Gant, G.H.; Gant, G.H.; Gant, G.H.

Existence of a slow inward current during the slow inward potential.
Pflügers Arch. 308 91 (1966)

Schwamborn, V.; Wittmann, R.; Kaumann, A.J.

Negative chronotropic and inotropic effects of enantiomers of Verapamil on spontaneously beating cells and atria of new-born rats
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharm. 293 R85 (1976)

Shigenobu, K.; Schneider, J.A.; Sperelakis, N.

Verapamil blockade of slow Na and Ca-responses in myocardial cells.
J.Pharm.Exp.Ther. 190 280-288 (1974)

Singh, B.N.; Vaughan Williams, E.M.

A fourth class of anti-dysrhythmic action? Effect of Verapamil on ouabain toxicity, on atrial and ventricular intracellular potentials, and on other features of cardiac function.
Card.Vasc.Res. 6 109-119 (1972)

Seifen, E.; Schaer, H.; Marshall, J.M.

Effect of calcium on the membrane potentials of single pacemaker fibres and atrial fibres in isolated rabbit atria.
Nature Vol 202 1223-1224 (1964)

Trautwein, W.

Membrane currents in cardiac muscle fibres.
Physiol. Reviews 53 793-835 (1973)

Waymouth, Ch.

Rapid proliferation of sublines of NCTC clone 929 mouse cells in a simple chemically defined medium (MB752/1).
J.Nat.Cancer Inst. 22 1003-1017 (1959)

Wit, A.L., Cranefield, P.F.

Effect of Verapamil on the sinoatrial and atrio-ventricular nodes of the rabbit and the mechanism by which it arrests reentrant atrioventricular nodal tachycardia.
Circ.Res. 35 413-425 (1974)

Wittmann, R.:

Funktionelle Charakterisierung der β -Adrenoceptoren kultivierter Herzmuskelzellen.
Dissertation, Düsseldorf, 1977

Zipes, D.P.; Mendez, C.

Action of manganese ions and TTX on atrioventricular nodal transmembrane potentials in isolated rabbit heart.
Circ.Res. 32 447-454 (1973)

Zipes, D.P.; Fisher, J.C.

Effects of agents which inhibit the slow channel on sinus node automaticity and atrioventricular conduction in the dog.
Circ.Res. 34 184-192 (1974)

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. J.G. Moser danke ich für die Vergabe des Themas, seine Unterstützung bei der Arbeit und viele hilfreiche Ratschläge.

Die Bereitstellung der technischen Einrichtung, der Versuchssubstanzen und Materialien, sowie finanzielle Unterstützung der Untersuchungen verdanke ich Herrn Prof. Dr. R. Kaufmann.

Von Herrn Dr. R. Wittmann erlernte ich die Methoden der Zellkultivation, der Versuchsplanung und Versuchsdurchführung. Den Aufbau der Versuchsanlage führten wir unter seiner Leitung gemeinsam durch.

Herr Dr. A.J. Kaumann vermittelte mir theoretische Grundlagen. Durch kritisches Studium der Zwischenergebnisse half er beim Fortgang vorliegender Experimente. Für die Untersuchungen an isolierten Vorhöfen stellte er mir seine Versuchsanlage zur Verfügung.

Für die Mitarbeit bei der Zellkultivation danke ich Frl. S. Wörner. Bei allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Institutes fand ich - wo nötig - Unterstützung.

Die Arbeit wurde mit Mitteln der DFG im Rahmen des Schwerpunktprogrammes Biochemie der Morphogenese (Prof. Dr. Moser) und des SFB 30 (Projekt D 3) wesentlich unterstützt.

LEBENS LAUF

Volker Schwamborn

Geburt: 30. Juni 1944, Waldbröl, deutsch

Eltern: Paul M. Schwamborn, geb.19.10.08
Städt. Angestellter a.D.

Martha S.T. Schwamborn, geb.27.06.09
geb.Menne

Realschullehrerin a.D.

Schulen: 1950-51 Grundschule Much/Siegkreis
1951-54 Grundschule Walsrode
1954-60 Realschule Walsrode
1960-64 Gew.Berufsschule Hannover
1964-65 Seefahrtsschule Leer/Ostfr.
1969-72 Abendgymnasium Kempen/Krefeld

Lehre, Beruf: 1960-64 Lehre als Rundfunk-u.Fernseh-
(vor Studium) techniker , Abschluß 1964 mit
Gesellenbrief
1965-66 Seefunkoffizier, Handelsmarine
1967-72 Fernmeldeinspektor DBP

Schulabschluß: 1972 Abitur

Studium: 1972-78 Humanmedizin, Universität
Düsseldorf

Studienabschluß: 1978 Staatsexamen, Approbation

Familienstand: 1968 Heirat, Ehefrau Ingeborg,
geb. Groen, 7.4.47
2 Kinder (1969,1977)

Beruf: 1978 Berufssoldat, Bundeswehr
(nach Studium)

